

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 22 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25840102

研究課題名(和文) 維管束の木部分化運命決定に至る転写経路の解明

研究課題名(英文) Study on a transcriptional network regulating xylem development

研究代表者

伊藤 恭子(大橋恭子)(Ito, Kyoko)

東京大学・理学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：90451830

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、維管束の分化過程の中でも前形成層から木部分化へと至る過程に着目し、その分子機構の解明を目的とした。まず、木部道管分化のマスター転写因子であるVND7の発現を制御する転写因子の単離を進めた。次に、前形成層から木部へ向かう分化の際の鍵転写因子であるATHB-8の下流制御因子の探索を行うために、ATHB-8過剰発現培養細胞株を作成し、トランスクリプトーム解析を行った。その結果、ATHB-8の制御下に、転写因子や植物ホルモンの制御に関わる因子が複数存在することを見出した。

研究成果の概要(英文)：To understand the molecular mechanism regulating vascular development, I tried to isolate key transcription factors, which regulate the differentiation process from procambium to xylem. I performed the insertional chromatin immunoprecipitation experiment to identify regulatory factors of a master regulator for xylem vessel differentiation. I also performed transcriptome analysis using ATHB-8 overexpressing suspension culture cells. I found that ATHB-8 regulates a lot of transcription factors and genes involved in phytohormone regulation.

研究分野：植物分子・生理科学

キーワード：植物 維管束 発生・分化 木部

1. 研究開始当初の背景

維管束は水分や栄養分、シグナル分子を植物体全体へと送る通道組織として、また、植物体に物理的な強度を与える支持組織としてはたらいている。維管束は木部と篩部、それらを生み出す前形成層および形成層からなっている。維管束の分化過程は、その組織としての重要性から長らく熱心に研究がなされてきた。その中でも特に、木部分化に関しては、道管細胞分化のマスター因子として NAC タイプの転写因子 VASCULAR RELATED NAC-DOMAIN PROTEIN6 (VND6) および VND7 が単離されて以来、その下流の因子や制御機構について、分子メカニズムの解明が進んだ (Kubo et al. *Genes Dev.* 2005, Yamaguchi et al. *Plant J.* 2010, Ohashi-Ito et al. *Plant Cell* 2010)。さらにその中でも、二次細胞壁の形成に関しては、転写ネットワークをはじめとした多くの関連遺伝子が明らかになった (Zhong et al. *Trends Plant Sci.* 2010)。このように、木部道管分化に関しては、分子メカニズムの理解が進んでいる状況であった。しかしながら、それ以前の維管束分化過程、特に前形成層細胞から木部へと分化決定がなされる過程の分子メカニズムの多くは明らかになっていなかった。

2. 研究の目的

道管の分化をはじめとする木部分化の最終過程の分子的知見は蓄積してきているものの、それ以前の過程に関する知見は非常に限られていた。そこで、本研究では前形成層から木部分化へと至る過程の分子機構を解明するために、まずはこの過程を制御する主要な転写ネットワークを明らかにすることを目的とした。木部道管細胞分化のマスター遺伝子は VND6 および VND7 であり、VND6 あるいは VND7 が機能を発揮することにより、二次細胞壁形成や細胞死といった道管分化に伴うイベントのすべての引き金が引かれる。したがって、道管分化の転写ネットワークでは VND6/VND7 を最終目的のハブ遺伝子として考えればよい。そこで、まず、この VND6/VND7 からその制御過程を前にさかのぼっていくことで、前形成層から木部分化に至る転写制御ネットワークを明らかにする (図1 方法1)。加えて、上記とは逆方向の解析として、前形成層から木部分化へと向かう方向の制御についても解析を行う。前形成層から木部分化へ向かう際に働く鍵因子の一つはホメオボックス遺伝子のクラスに属する遺伝子群 (HD-ZIP) であると考えられる。HD-ZIP 遺伝子群は前形成層から木部前駆細胞領域に発現し、それらの機能獲得型変異体では木部領域が広がる表現型がみられ、逆にシロイヌナズナに5つある HD-ZIP 遺伝子すべての機能を欠損すると木部道管が全く形成されなくなるからである (Cano-Delgad et al. *Annu Rev Cell*

Dev Biol. 2010, Carlsbecker et al. *Nature* 2010)。そこで、HD-ZIP 遺伝子群に着目し、そのターゲット遺伝子解析を行うことで前形成層から下流に向かう転写制御機構を明らかにする (図1 方法2)。

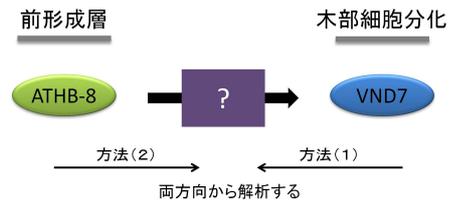


図1 本研究の概略

3. 研究の方法

(1) 道管分化のマスター遺伝子 VND7 の発現を誘導する上流因子の解析

VND7 は、植物体全体の道管分化を司るマスター遺伝子の一つであり、最終分化のハブ遺伝子であると考えられる。そこで、VND7 を起点として解析を行うことにした。VND7 の発現を制御する因子を単離するために、これまでに、主に動物細胞で用いられてきた手法である、insertional Chromatin Immunoprecipitation (iChIP) 法を、シロイヌナズナへの適用することにした (図2)。iChIP法では、外来性の DNA 結合因子 LEXA が結合する配列 (LEXA 結合配列) を解析対象遺伝子のゲノム領域に挿入し、さらにタグをつけた LEXA を導入する。次に、その LEXA に結合しているタグを用いて Chromatin Immunoprecipitation を行うことにより、解析対象遺伝子のゲノム領域に結合しているタンパク質を回収する方法である (Hoshino and Fujii, *J Biosci Bioeng.* 2009)。この方法により、VND7 の発現を制御する制御因子の探索が可能であると考え、実施することとした。

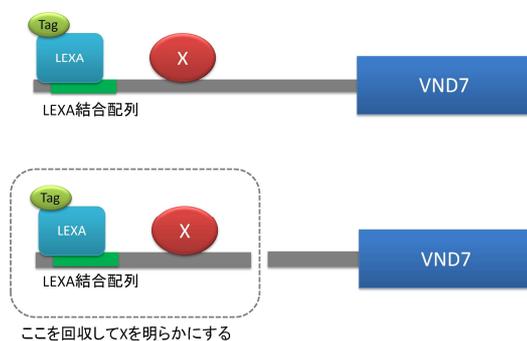


図2 iChIP 法の概略図

VND7 のプロモーター領域に結合し、発現を制御するタンパク質「X」を単離することができる。

(2)木部分化誘導転写因子 ATHB-8 の制御する因子の解析

HD-ZIP は前形成層から木部へ向かう分化の際の鍵転写因子であると考えられる。そこで、HD-ZIP 遺伝子の制御するターゲット遺伝子を明らかにすることで、この経路の次の重要制御因子の単離を試みた。シロイヌナズナには5つのHD-ZIP 遺伝子があるが、この中でも特に維管束で強く発現するATHB-8を解析の対象とした(Baima et al. Development 1995)。ATHB-8には、様々な抑制機構が働いている(Zhou et al. PCP 2007, Wenkel et al. Plant Cell 2007)。それらの抑制機構を可能な限り排除するために、シロイヌナズナの懸濁培養細胞を用いて解析を行うことにした(図3)。多様な細胞が入り混じっている個体ではなく、均一な培養細胞を利用することで、効率良くターゲット遺伝子の単離が可能であると考えた。さらに、培養細胞には、十分な量の細胞を確保することや遺伝子導入することが容易であるといった利点もある。ATHB-8を薬剤(エストロジェン)添加により過剰発現させることのできる形質転換培養細胞株を作成し、これを材料としてトランスクリプトーム解析を行う。これにより、ATHB-8のターゲット遺伝子を明らかにする。



図3 シロイヌナズナ懸濁培養細胞

4. 研究成果

(1)道管分化のマスター遺伝子 VND7 の発現を誘導する上流因子の解析

まず、iChIP法に基づき、VND7プロモーターに結合する因子を単離するために必要となるベクターのコンストラクションを行った。LEXA結合配列の挿入部位を変えた2種類のLEXA結合配列を含むVND7プロモーター::YFPを作成した(コンストラクト1)。LEXA発現コンストラクトは、エストロジェン誘導型と、VND7プロモーター誘導型、コントロールとしてSCARECROWプロモーター誘導型の3種類を作成した(コンストラクト2)。次に、これらのコンストラクト1とコンストラクト2をそれぞれ一つずつもつシロイヌナズナの形質転換植物を作成した。

次に、これらの形質転換体において、外来性因子LEXAが発現し、タンパク質が蓄積していることを、ウエスタンブロット法により

確認した。特に、エストロジェン誘導株では、LEXAの蓄積が顕著であったため、エストロジェン誘導型LEXA株を以後の解析に用いることにした。さらに、これらの植物体を使って、immunoprecipitationの条件を検討した。今後これを用いた研究を進めることにより、シロイヌナズナにおいてもiChIP法を用いて制御因子の単離が可能であると考えている。

(2)木部分化誘導転写因子 ATHB-8 の制御する因子の解析

前形成層から木部へ向かう分化の際の鍵転写因子であると考えられるATHB-8の下流制御因子の探索を試みた。

まず、ATHB-8遺伝子をエストロジェンにより発現誘導可能なコンストラクトを作成した。ATHB-8はマイクロRNAにより負の制御を受けることが明らかになっているため、このマイクロRNAによる制御に耐性となるようにマイクロRNA結合配列に塩基置換を施した。この際、アミノ酸配列には変化が生じないようにした。

次に、シロイヌナズナの培養細胞に作成したATHB-8過剰発現ベクターを導入した形質転換株を作成した。この培養細胞株にエストロジェンを添加して培養した細胞、非添加で培養した細胞をサンプリングし、これらを用いてトランスクリプトーム解析を行った。これにより、ATHB-8過剰発現時に発現量が変動する下流遺伝子の探索を行った。

その結果、エストロジェン添加24時間後に発現量が2倍以上上昇する遺伝子が、290遺伝子あることがわかった。その中には、これまで既に報告がなされていたHD-ZIP遺伝子のターゲット遺伝子(ZPR1、ZPR3、など、Wenkel et al. Plant Cell 2007, Kim et al. Plant Cell 2008)が複数含まれていたことから、今回用いた方法は適切であったと考えられる。また、290の遺伝子の中には、転写制御因子が28遺伝子含まれていた。さらに、この転写制御因子のうち11遺伝子は維管束あるいは木部で発現することがわかっている遺伝子であった。したがって、今回の解析により、ATHB-8の下流の転写ネットワークを明らかにするための解析ターゲットを見出すことができたと言える。今後、これらの研究を進めていくことで、前形成層から木部の細胞分化に至る経路を解明できると考えられる。

また、ATHB-8のターゲット遺伝子には、転写制御因子だけでなく、いくつかの種類の植物ホルモンの制御に関連する因子も複数存在した。ATHB-8が植物ホルモンの量や応答性を制御することにより、細胞分化の方向性を制御している可能性も考えられた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Kyoko Ohashi-Ito, Hiroo Fukuda (2014)
Initiation of vascular development,
Physiologia Plantarum, 151, 142-146.

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

伊藤恭子 (Ito Kyoko)

東京大学・大学院理学系研究科・准教授

研究者番号：90451830

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし